

PENAPISAN BAKTERI SIMBION LAMUN *Thalassia hemprichii* PENGHASIL ENZIM HIDROLASE

(*Screening of Seagrass Symbiont Bacteria Thalassia hemprichii
Producing Hydrolase Enzymes*)

Rizky I. Moroki¹, Elvy L. Ginting^{1*}, Stenly Wullur¹, Sandra Tilaar¹, Veibe Warouw¹, Edwin L.A. Ngangi²

1. Program Studi Ilmu Kelautan, FPIK, UNSRAT Manado
2. Program Studi Budidaya Perairan, FPIK UNSRAT Manado

*Penulis korespondensi: like.ginting@unsrat.ac.id

ABSTRACT

The research aims to determine the ability of the seagrass symbiont bacteria *Thalassia hemprichii* to produce protease and amylase. The symbiont bacteria *T. hemprichii* had been cultured in the laboratory. Five isolate bacteria namely 3M.2, E2.2, E3.2, 6.2 and 5.2 were analyzed in this research. Bacterial enzyme activity was screened by growing the bacterium using the paper disc on skim milk agar and starch agar media for 2 x 24 hours. Enzyme activity was indicated by the formation of a clear zone around the bacterial colonies. The proteolytic (IP) and amylolytic indexes (IA) were calculated by dividing the diameter of clear zone with the bacterium colonies. The results showed that the bacterial isolate 3M.2, E2.2 and 6.2 could produce proteases in 24 hours incubation with IP of 1,67, 1,20 and 1,33, respectively. While isolate 5.2 could produce protease after being incubated for 48 hours with an IP of 1,03. During the 48 hours incubation time, there were decrease in the IP of bacterial isolates of 3M.2, E2.2 and 6.2. Furthermore, 3M.2 bacterial isolate was able to produce amylase in 24 hours of incubation with an IA of 1,27. Meanwhile, bacterial isolate E2.2 could produce amylase after being incubated for 48 hours with an IA of 1,17.

Keywords: Seagrass *T. hemprichii*, hydrolase enzymes, amylase, protease

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kemampuan bakteri simbiosis lamun *Thalassia hemprichii* dalam menghasilkan enzim protease dan amilase. Sampel bakteri yang diuji merupakan bakteri yang telah dikultur di Laboratorium, berjumlah 5 isolat yakni 3M.2, E2.2, E3.2, 6.2 dan 5.2. Pengujian aktivitas enzim bakteri dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media skim milk agar dan media amilum selama 2 x 24 jam dengan menggunakan metode kertas cakram. Aktivitas enzim ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh, dan selanjutnya dihitung indeks proteolitik dan amilolitik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri 3M.2, E2.2 dan 6.2 dapat menghasilkan protease selama waktu inkubasi 24 jam dengan IP sebesar 1,67 dan 1,20 dan 1,33 secara berurutan. Sedangkan isolat 5.2 dapat menghasilkan protease setelah diinkubasi selama 48 jam dengan IP sebesar 1,03. Pada waktu inkubasi 48 jam, terjadi penurunan IP dari isolat bakteri 3M.2, E2.2 dan 6.2. Isolat bakteri 3M.2 mampu menghasilkan amilase pada waktu inkubasi 24 jam dengan IA sebesar 1,27, sedangkan isolat bakteri E2,2 dapat menghasilkan amilase setelah diinkubasi selama 48 jam dengan IA sebesar 1,17.

Kata Kunci : Lamun *T. hemprichii*, enzim hidrolase, amilase, proteas

PENDAHULUAN

Enzim adalah kelompok protein yang berperan penting dalam aktivitas biologi. Enzim berfungsi sebagai katalisator yang dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan hasil reaksi. Hal ini disebabkan karena enzim mengkatalisator reaksi-reaksi tanpa mengubah struktur reaksi tersebut sehingga enzim biasa disebut biokatalisator (Rachmawaty & Madihah, 2013). Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis untuk proses biokimia. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi daripada tanpa menggunakan enzim sebagai katalis (Poedjiadi, 2006). Enzim hidrolase adalah sekumpulan enzim yang menguraikan suatu zat dengan pertolongan air, disebut hidrolase karena enzim ini menghidrolisis molekul-molekul besar menjadi komponen-komponen kecil yang dapat digunakan. Berdasarkan substrat yang diuraikan, enzim hidrolase dibagi atas kelompok kecil yaitu enzim karbohidrase, esterase, kitinase dan protease (Suberata, 2021).

Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme. Protease tidak hanya berperan dalam proses metabolisme seluler, namun juga dapat diaplikasikan dalam bidang industri. Enzim ini adalah salah satu enzim skala industri dengan tingkat penjualan hingga 60% dari total penjualan enzim di dunia. Aplikasi enzim protease di antaranya pada industri pembuatan detergen, industri penyamakan kulit, bahan aditif pada industri pangan, dan zat terapeutik pada bidang farmasi (Grupta *et al.* 2002; Rao *et al.* 1998). Amilase adalah enzim yang mempunyai kemampuan memecah ikatan glukosida pada polimer pati. Penggunaan amilase dilaporkan mengalami peningkatan setiap tahunnya. Permintaan akan enzim golongan amilase telah mencapai sekurang-kurangnya 25% dari keseluruhan pasar enzim (Vaseekaran *et al.*, 2010). Kelompok enzim ini memiliki

banyak variasi dalam aktivitasnya, sangat spesifik, tergantung pada tempatnya bekerja (Sianturi, 2008).

Enzim umumnya diisolasi dari berbagai jenis mikroorganisme. Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim dalam jumlah dan jenis yang bervariasi, waktu produksinya lebih cepat serta mudah dikontrol. Salah satu mikroorganisme yang menghasilkan enzim adalah bakteri. Bakteri adalah sekelompok organisme hidup dalam jumlah sangat banyak yang dapat ditemukan di hampir semua tempat, baik di tanah, air maupun udara, bahkan di dalam tubuh manusia dan bersimbiosis dengan organisme lain maupun sebagai agen parasit. Pertumbuhan bakteri banyak dijumpai hidup dengan cara berasosiasi dengan berbagai organisme laut benthik (Abubakar *et al.* 2011). Salah satu organisme benthik yang berasosiasi dengan bakteri ialah lamun. Lamun *T. hemprichii* merupakan spesies yang paling mendominasi di perairan Bohowo. Uji aktivitas enzim hidrolase dari bakteri simbiosis lamun *T. hemprichii* belum diteliti. Penelitian ini dilaksanakan untuk menguji aktivitas enzim hidrolase, khususnya protease dan amilase dari bakteri simbiosis lamun tersebut.

METODE PENELITIAN

Sampel bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri yang telah dikultur di Laboratorium Biologi Molekular dan Farmasetika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi. Isolasi bakteri tersebut, diisolasi dari lamun *Thalassia hemprichii* yang diambil dari Perairan Bohowo, Sulawesi Utara. Jumlah isolat yang digunakan berjumlah 5 isolat dengan kode 3M.2, E2.2, E3.2, 6.2, 5.2.

Penyegaran dan Penentuan Isolasi Bakteri

Penyegaran bakteri dilakukan untuk menumbuhkan kembali isolate bakteri yang akan diteliti agar dapat tumbuh dengan optimal. Penyegaran dilakukan dengan menumbuhkan masing-masing isolate bakteri pada media Nutrient Broth (NB)

selama 2 x 24 jam pada suhu 36°C. Masing-masing bakteri yang tumbuh pada media Nutrient broth yang ditandai dengan kekeruhan media, ditumbuhkan kembali dalam media Nutrient Agar (NA), dengan cara goresan sig-sag dan diinkubasi pada suhu 36°C selama 2 x 24 jam. Setiap koloni bakteri yang tumbuh, diamati karakteristik morfologi untuk memastikan koloni bakteri yang akan digunakan, tidak ditumbuhi oleh kontaminan.

Penapisan Bakteri Penghasil Protease dan Amilase

Pembuatan Media Protease

Media protease digunakan dalam pengujian aktivitas protease dari bakteri. Pembuatan media protease dilakukan dengan melarutkan 2 gr susu skim milk bubuk, 2 gr agar dan 1 gr NB dalam 100 ml aquades, di atas *hot plate*. Selanjutnya disterilisasi menggunakan autoclave selama ± 15 menit pada suhu 121°C. Media dituangkan ke dalam cawan petri steril secara merata dan dibiarkan mengeras, setelah itu dibungkus menggunakan *plastic wrap* serta diinkubasi selama 24 jam untuk memastikan media tidak terkontaminasi.

Pembuatan Media Amilase

Media amilase digunakan untuk pengujian aktivitas amilase dari bakteri. Pembuatan media amilase dengan melarutkan agar 2 gr, amilum 2 gr, dan NB 1 gr ke dalam aquades 100 ml, Bahan-bahan tersebut dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer*. Media disterilisasi menggunakan *autoclave* selama ± 15 menit pada suhu 121°C. Setelah disterilisasi, secara aseptik media dituang ke dalam cawan petri steril secara merata, kemudian dibiarkan mengeras. Setelah mengeras dan dingin, dibungkus menggunakan *plastic wrap* dan diinkubasi selama 1 X 24 jam untuk memastikan tidak terkontaminasi.

Penentuan Bakteri Penghasil Protease dan Amilase

Setiap isolat bakteri ditumbuhkan pada media NB. Dengan menggunakan pinset steril, kertas cakram steril dicelupkan

ke dalam kultur bakteri kemudian diletakkan secara hati-hati di atas media protease dan amilase. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 36°C selama 2 X 24 jam. Diamati adanya aktivitas kitinase dan protease dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh pada kertas cakram. Besarnya kemampuan bakteri dalam menghasilkan protease dan amilase dapat ditandai dengan perhitungan indeks proteolitik dan amilolitik. Indeks proteolitik dan amilolitik berdasarkan Utami, *et al* (2017) dan Sumardi *et al.* (2010).diperoleh sebagai berikut:

$$IP_{\text{bening}} = \frac{D.Zona}{D.Koloni} \quad IA = \frac{D.Zona \text{ bening}}{D.Koloni}$$

Keterangan : IA : Indeks Amilolitik
IP : Indeks Proteolitik
D : Diameter

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Enzim Protease

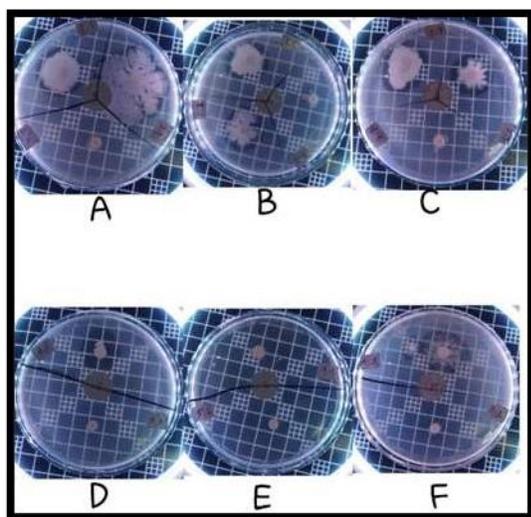
Berdasarkan pengamatan, isolat 3M.2 dan E2.2 dan 6.2 menunjukkan adanya aktivitas protease pada waktu inkubasi 24 jam. Sedangkan isolat E3.2 dan 5.2 tidak menunjukkan adanya aktivitas protease. Hal ini diindikasikan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri pada isolat 3M.2 dan E2.2 dan 6.2 (Gambar 3 dan Tabel 2). Zona bening yang terbentuk menjadi indikator bahwa bakteri merupakan penghasil protease karena mampu merombak protein dalam media *skim milk* menjadi peptida-peptida dan asam amino yang larut. *Skim milk* dipilih sebagai media karena kandungan lemak pada susu *Full cream* (Rusdwitarsi dan Wikandari, 2014). Untuk mensekresikan protease yang dapat mendegradasikan protein, maka pada medium disertakan susu skim yang mengandung kasein. Kasein merupakan protein utama susu, suatu mikromolekul yang tersusun atas sub unit asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Kasein berfungsi sebagai substrat bagi enzim protease (Puspitasari *et al.*, 2012).

Adanya aktivitas protease isolat 5.2 terlihat pada waktu inkubasi 48 jam (Gambar 4 dan tabel 3). Hal ini menindikasikan bahwa

isolat 5.2 membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama dalam menghasilkan protease.

Tabel 2. Indeks Proteolitik pada waktu inkubasi 24 jam

Isolat Bakteri	3M.2			E2.2			E3.2			6.2			5.2		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ulangan															
Diameter zona bening (cm)	3	3	3,3	5,1	3,1	2,6	0	0	0	2,4	0	3,6	0	0	0
Diamater koloni (cm)	2,4	2,3	2,2	4,9	2,2	2,1	1	1	1	0,8	0,8	3,5	1	0,7	0,9
IP	1,3	1,3	1,5	1	1,4	1,2	0	0	0	3	0	1	0	0	0
IP rata	1,67			1,20			0			1,33			0		



Gambar 5. Aktivitas protease pada waktu inkubasi 24 jam

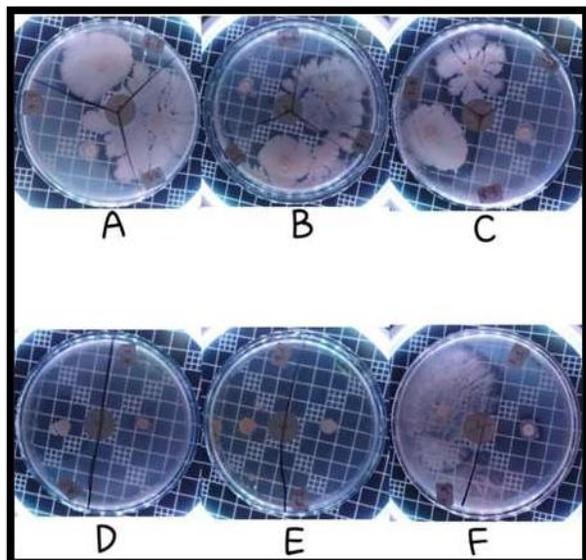
Keterangan :

- A. Pengulangan 1 D. Pengulangan 1
- B. Pengulangan 2 E. Pengulangan 2
- C. Pengulangan 3 F. Pengulangan 3

Dilain pihak, isolat bakteri 3M.2, E2.2 dan 6.2 menunjukkan penurunan dalam menghasilkan protease yang ditandai dengan penurunan indeks proteolitik setelah ditambah waktu inkubasi yakni selama 48 jam. Keadaan ini menunjukkan bahwa, ketiga isolat ini bertumbuh dengan bertambah waktu inkubasi, tetapi kemampuan bakteri dalam menghasilkan protase menjadi kecil bahkan mungkin berhenti. Sedangkan isolat E3.2 tidak menghasilkan enzim protease. Laksmiwati *et al.* (2016) menyatakan bahwa seluruh bakteri umumnya memiliki enzim protease di dalam sel, namun tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler. Oleh sebab itu, terdapat bakteri tidak menunjukkan zona bening pada media yang mengandung substrat protein, seperti isolat E3.2. Keadaan ini karena enzim protease tidak diekresikan ke dalam media untuk memecahkan protein dalam substrat.

Tabel 3. Indeks Proteolitik pada waktu inkubasi 48 jam

Isolat Bakteri	3M.2			E2.2			E3.2			6.2			5.2		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ulangan															
Diameter zona bening (cm)	5	4	3,7	7	5,4	2,9	0	0	0	4,2	0	6,8	1,3	0	1,5
Diamater koloni (cm)	4	2,8	3	6,8	5	2,6	1,1	1,4	1,8	5,2	1	6,7	1,2	0,9	1,1
IP	1,3	1,4	1,3	1	1,1	1,1	0	0	0	0,8	0	1	1,1	0	1
IP rata	1,33			1,07			0			0,60			1,03		



Gambar 6. Aktivitas protease pada waktu inkubasi 48 jam

Keterangan :

- A. Pengulangan 1 D. Pengulangan 1
- B. Pengulangan 2 E. Pengulangan 2
- C. Pengulangan 3 F. Pengulangan 3

Aktivitas Enzim Amilase

Berdasarkan hasil penelitian ini, bakteri simbiosis lamun *T. hemprichii* isolat 3M.2 memiliki kemampuan menghasilkan enzim amilase. Hal ini diindikasikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri. Adapun indeks amilolitik isolat 3M.2 sebesar 1,27 pada waktu inkubasi 24 jam

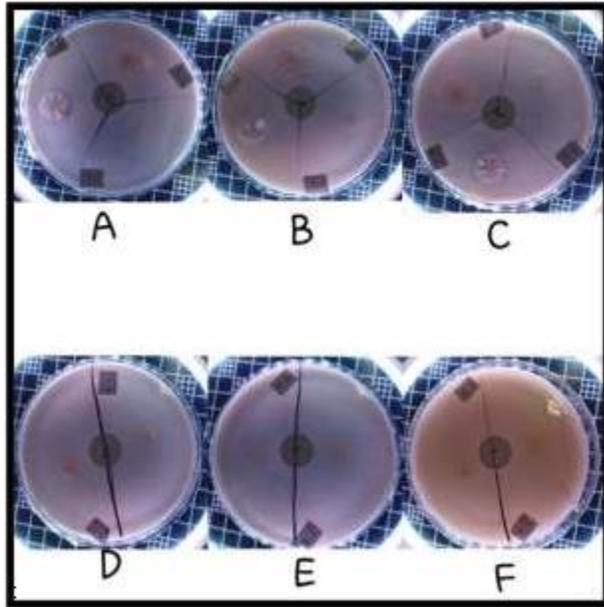
(Tabel 4 dan gambar 7). Indeks amilolitik isolat 3M.2 meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi. Saat isolat diinkubasi pada 48 jam, indeks amilolitik menjadi 1,3 (Tabel 5 dan gambar 8). Hal ini mengindikasikan bahwa produksi enzim amilase dari isolat bakteri 3M.2 dapat meningkat dengan pertambahan waktu inkubasi selama 48 jam. Di lain pihak, isolat E2.2 menunjukkan adanya aktivitas amilase pada waktu inkubasi 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa isolat ini membutuhkan waktu yang lebih lama untuk dapat memanfaatkan amilum yang dikandung oleh media.

Indeks amilolitik terbentuk akibat diproduksi enzim amilase oleh bakteri pada media amilum. Enzim amilase yang dihasilkan dari bakteri amilolitik umumnya berupa enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel (Spilatro, 2010).

Isolat 3M.2 memiliki indeks amilolitik terbesar atau memiliki kemampuan yang besar untuk mendegradasi amilum jika dibandingkan dengan isolat yang lainnya. Semakin banyak konsentrasi substrat maka sisi aktif enzim yang berkontak dengan substrat juga akan bertambah banyak, sehingga semakin banyak amilosa yang dihidrolisis menjadi glukosa (Simanjuntak, 2003).

Tabel 4. Indeks Amilolitik pada waktu inkubasi 24 jam

Isolat Bakteri	3M.2			E2.2			E3.2			6.2			5.2		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ulangan	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Diameter zona bening (cm)	2,3	2,2	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diameter koloni (cm)	1,8	1,8	1,7	2,2	2,2	2,3	1	1	1	1,2	1	1	0,7	0,9	1
IA	1,3	1,2	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IA Rata-rata	1,27			0			0			0			0		

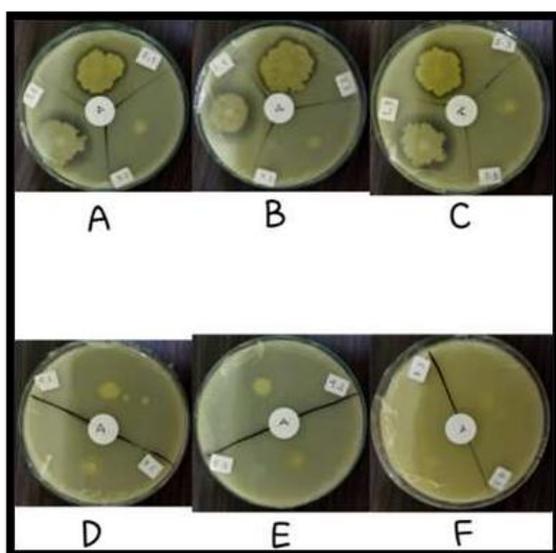


Gambar 7. Aktivitas amilase pada waktu inkubasi 24 jam

Ket : A. Pengulangan 1 D. Pengulangan 1
 B. Pengulangan 2 E. Pengulangan 2
 C. Pengulangan 3 F. Pengulangan 3

Tabel 5. Indeks Amilolitik pada waktu inkubasi 48 jam

Isolat Bakteri	3M.2			E2.2			E3.2			6.2			5.2		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Diameter zona bening (cm)	3,7	3,4	3,7	3,1	3,3	2,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diamater koloni (cm)	3,1	2,3	3	2,3	2,9	2,6	1	1	1,3	1,3	1,2	1	1,4	1,3	1
IA	1,2	1,5	1,2	1,3	1,1	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IA Rata-rata	1,30			1,17			0			0			0		



Gambar 8. Aktivitas amilase pada waktu inkubasi 48 jam

Ket : A. Pengulangan 1 D. Pengulangan 1
 B. Pengulangan 2 E. Pengulangan 2
 C. Pengulangan 3 F. Pengulangan 3

KESIMPULAN

Bakteri simbiosis lamun *T. hemprichii* 6.2 dan 5.2 dapat menghasilkan enzim protease sedangkan 3M.2 dan E2.2 dapat menghasilkan protease dan amilase. Bakteri simbiosis ini dapat dimanfaatkan dalam memproduksi enzim hidrolase (protease dan amilase) untuk dapat dimanfaatkan dalam aplikasi industri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, H., Wahyudi A.T., dan Yuhana. M. 2011. Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Jaspis sp. Sebagai Senyawa Anti Mikroba. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 16 (1), 32-40.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59: 15-32.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, T. 2006. Dasar-dasar Biokimia. Edisi Revisi. UI Press, Jakarta. 219 hal.
- Puspitasari, F.D., Shovitri, M., Kuswytasari, N.D., 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri aerob proteolitik dari tangka septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 1(1), E1-E4.
- Rachmawaty dan Madihah, 2013. Potensi Perlakuan Awal Limbah Kulit Udang Untuk Produksi Enzim Kitinase Oleh *Trichoderma Virens* Pada Fermentasi Substrat Padat. *Jurnal Bionature*, 14(1), 33- 36.
- Rao, M.B. Tanksale, A.M. Ghatge, M.S. dan Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635.
- Sianturi, D.C. 2008. Isolasi Bakteri dan Uji Aktifitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru Sumatera Utara. Thesis. Universitas Sumatera Utara. Medan.79 hal.
- Simanjuntak, M. T. 2003. Biokimia. Sumatera Utara: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. 110 hal.
- Suberata, I. Wayan. *Metabolisme Mikroba*. simdos.unud.ac.id (Diakses tahun 2021). 46 hal.
- Sumardi, Ekowati, C. N., Haryani, D. 2010. Isolasi *Bacillus* Penghasil Selulase dari saluran Pencernaan Ayam Kampung. *Jurnal Sains MIPA*, 16(1), 62-68.
- Utami S. Hastuti., Febrian S.A. Nugraheni., Putri M. Asna. 2017. Identifikasi dan Penentuan Indeks Hidrolisis Protein pada Bakteri Proteolitik dari Tanah Mangrove di Margomulyo, Balikpapan. 67 hal.
- Vaseekaran, S., Balakumar, S., Arasaratnam, V. 2010. Isolation and identification of a Bacterial Strain Production Thermostable α -Amylase. *Tropical Agricultur Research*, 22(1), 1-11.